R. UNIVERSITÀ DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
R. OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

204

IMPERIAL MYCOLOGICAL INSTITUTE
4 MAR 1947

O. VERONA

Nutrizione e virulenza in "Bac. tumefaciens"

Estratto dalla *Rivista di Patologia Vegetale*, Fasc. 9-10
Anno XXXII, 1942 (XX)
Direttore: Prof. Luigi Montemartini

O. VERONA

Nutrizione e virulenza in " Bact. tumefaciens „

Durante il corso di nostre ricerche sopra qualche aspetto biologico di *B. t.* abbiamo avuto modo di notare, in armonia con quanto verificasi, più o meno, con altre specie fito- o zoopatogene, variazioni di sviluppo e di virulenza in ceppi coltivati sopra substrati diversi.

Tale osservazione, suffragata per *B. t.* da alcuni reperti di Quirk [1] che riuscì ad ottenere, da un unico ceppo, stipiti virulenti e non virulenti, mediante successivi passaggi in mezzi a differente pH, ci ha suggerito di definire meglio la natura e l' entità di tali variazioni in rapporto anche ad eventuali fenomeni dissociativi.

All' uopo abbiamo allestito un certo numero di substrati tra i quali il terreno di Berthelot [2] dato come particolarmente adatto allo sviluppo di *B. t.*

Più esattamente :

1. - Terreno di Berthelot.

Sol. A :	fosfato monopotassico	gr.	2.—
	fosfato bisodico	»	1,50
	nitrato di potassio	»	0.25
	solfato di potassio	»	0.50
	fosfato biammonico	»	1.—

	solfato di magnesio	»	0.20
	saccarosio	»	20,—
	glucosio	»	10.—
	asparagina	»	4.—
	acqua	cc.	750.—
Sol. B :	ac. citrico	gr.	2,—
	ac. tartarico	»	1.—
	ac. malico	»	1.—
	acqua	cc.	100.—

La reazione di questa soluzione sarà acida. Si neutralizza con cenere di piante di geranio. Si agita e si filtra.

Si mescola A. con B. e si porta ad un litro. Indi si agarizza.

2. - Infuso di carne agarizzato all' 1,5 % (3).
3. - Acqua di fonte 100 + peptone 1.5 + agar 1.5.
4. - » » » 100 + asparagina 1 + agar 1.5.
5. - » » » 100 + peptone 15 + glucosio 2 + agar 1.5.
6. - » » » 100 + glucosio 2 + agar 1.5.
7. - » » » 100 + glicerina 2 + agar 1.5.
8. - » » » 100 + amido 2 + agar 1.5.

Su questi substrati è stato passato per sei volte consecutive, alla distanza di 15 giorni, un ceppo di *B. t.* — già impiegato in nostre precedenti esperienze — e da tempo coltivato nel substrato 2.

Le differenze di sviluppo, nei vari substrati, furono fin dai primi passaggi evidentissime e al termine del sesto passaggio lo sviluppo poteva così considerarsi :

Substrato		Sviluppo
1	+ + + + +	(molto abbondante)
2	+ + + + +	(id. id.)
3	+ + + +	(abbondante)
4	+	(scarsissimo fino a perdersi al terzo trapianto)
5	+ + + +	(buono)
6	+	(scarsissimo)
7	+ + +	(piuttosto scarso)
8	+	(scarsissimo)

Le differenze relative allo sviluppo delle patine non furono soltanto di massa. Cambiamenti più o meno profondi si ebbero anche nei caratteri delle patine in relazione ad insorti fatti dissociativi come si potè confermare attraverso la reazione di Alessandrini [agglutinazione alla tripaflavina ([4])].

Pari modificazioni si ebbero nei caratteri morfologici e di mobilità ottenendosi nei ceppi variati forme più lentamente mobili o scarsamente mobili e di aspetto irregolare per dimensione e forma.

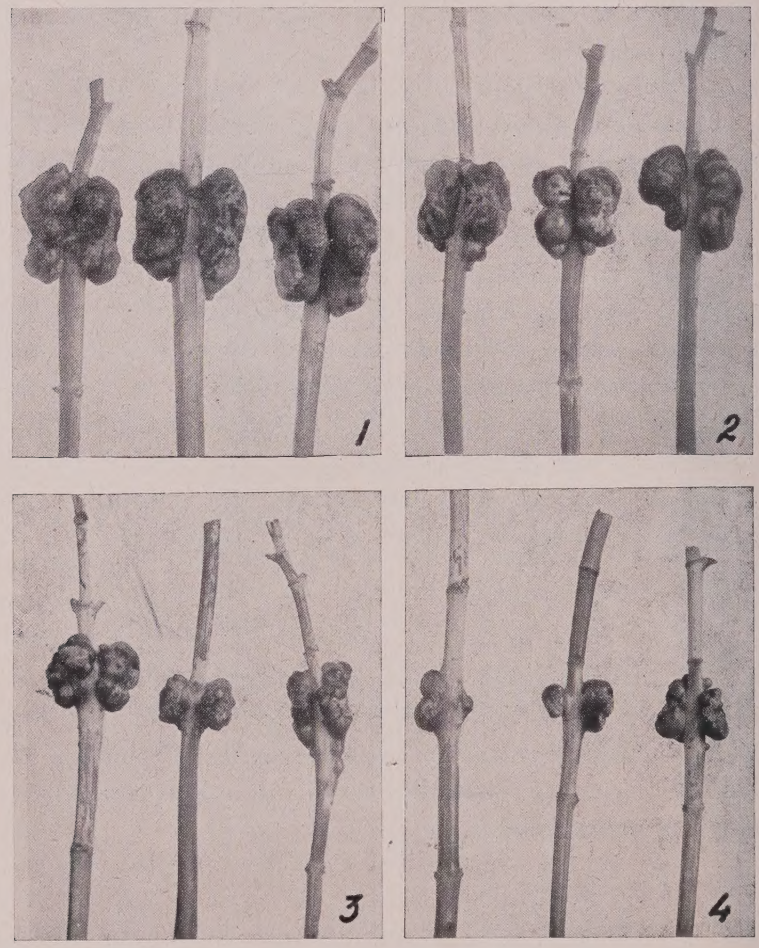
Emerse quindi come anche il *B. t.* sia sensibile a variazioni costituzionali del mezzo alimentare e come, in conseguenza, si determinino fenomeni dissociativi. Nel contempo risultò confermato come il terreno di Berthelot si presti magnificamente alla coltura del germe. Lo sviluppo in esso si dimostrò, anzi, leggermente superiore a quello registrato in agar all'infuso di carne ove, d'altronde, la specie prospera rigogliosa mantenendo invariati i suoi caratteri di sviluppo, di fase e di virulenza (*).

*
* *

Con i ceppi provenienti dai diversi substrati (ad eccezione del ceppo di cui al substrato 4 perchè perduto al terzo trapianto) furono eseguite prove di virulenza inoculando, con i soliti accorgimenti, giovani piante di Ricino coltivate in vaso.

(*) Sono circa sette anni, infatti, che noi coltiviamo *B. t.* su questo substrato senza notare variazioni di sorta, neppure nella virulenza. Anche Gioelli, recentemente, lo trovava fortemente virulento (cfr. : GIOELLI F. - *L' azione di filtrati di B. t. su colture in vitro di tessuti vegetali,* Riv. di Pat. Veg., XXX, 1940.

L' esperienza fu protratta per un tempo sufficientemente lungo in modo da poter rendere meglio evidenti eventuali differenze nella formazione dei tumori.



Tumori sviluppati, su piante di ricino, a seguito di inoculazioni con *Bact. tumefaciens* proveniente : 1, dal substrato n. 1 ; 2, dal substrato n. 3 ; 3, dal substrato n. 5 ; 4, dal substrato n. 6.

Questi, a suo tempo, dopo di avere eseguito alcuni rilievi soggettivi, furono tagliati e, quattro per ogni lotto, furono pesati allo stato fresco ed allo stato secco ottenendosi quanto figura nell' annessa tabella.

N. della coltura	Peso fresco gr.		Peso secco gr.		Ceneri gr.	
	di un tumore	medio	di un tumore	medio	di un tumore	medio
1	10.4782 9.0042 10.0290 8.9643	9.6189	1.9822 1.4510 1.6418 1.2042	1.5698	0.1308 0.1698 0.1960 0.1658	0.1656
2	4.7406 5.8262 6.3784 4.6756	5.4052	0.8576 0.9202 1.0668 0.7084	0.8882	0.1104 0.1010 0.1252 0.0848	0.1053
3	2.9382 1.5600 2.6478 1.1045	2.0626	0.5518 0.3516 0.3126 0.2203	0.3591	0.0670 0.0202 0.0370 0.0191	0.0358
4	—	—	—	—	—	—
5	3.2031 2.9019 2 7143 1.9336	2.6882	0.5717 0.5161 0.4605 0.3742	0.4806	0.0668 0.0661 0.0504 0.0386	0 0559
6	1.5600 2.6478 2.3456 1.8041	2.0894	0.2926 0.3516 0.3466 0.3143	0.3263	0.0202 0.0370 0.0216 0.0220	0.0252
7	2.3996 2.4477 2.2739 2.9786	2.5249	0.3781 0.3946 0.2830 0.4168	0.3681	0.0493 0.0451 0.0289 0.0510	0.0435
8	1.5580 1.2246 1.1854 1.4503	1.3546	0.2741 0.1824 0.1937 0.2541	0.2261	0.0238 0.0210 0.0213 0.0222	0.0221

I dati ponderali di cui alla tabella, confermando i rilievi soggettivi, mettono in evidenza come i tumori si siano diversamente sviluppati in conseguenza della inoculazione dei diversi ceppi. La natura del mezzo di sviluppo influisce quindi sulla virulenza del genere ed anzi, in modo sensibile. Basti al riguardo confrontare i tumori prodotti dal ceppo n. 1 con quelli prodotti dal ceppo n. 8. A conferma di quanto precedentemente avevamo stabilito ([4]) sono poi i ceppi in fase « S » quelli che si sono dimostrati più virulenti.

Tali constatazioni trovano la loro importanza nello studio dei mezzi, anche naturali, di conservazione, propagazione e infettività di *B. t.* e contribuiscono alla conoscenza delle cause del determinismo dell' infezione.

Dalla Facoltà Agraria, Istituto di Patologia Vegetale e Microbiologia della R. Università di Pisa.

RIASSUNTO

Coltivato *Bact. tumefaciens* in mezzi di diversa costituzione ne sono risultate differenze nei caratteri di sviluppo, di fase e di virulenza.

BIBLIOGRAFIA

(1) QUIRK A. I. — *Pure smooth and rough colony types at will.* – Sci., N. S., **74**, 1931.

(2) BERTHELOT A. — *Sur un milieu convenant particulierment à la culture du* Bact. tumefaciens. – Bull. Soc. Chimie biol., **12**, 109, 1930.

(3) Per la preparazione v.: PEROTTI R. — *Tecnica di Biologia Vegetale, ecc.* – Roma, 1928.

(4) VERONA O. — *Qualche osservazione sulla fase « R » di* Bact. tumefaciens. – Ann. Fac. Agr. R. Un. di Pisa, N. S., IV, 1941.